



|  |   |  |
|--|---|--|
| (51) Международная классификация изобретения 6:<br>B01L 3/00   | A1  | (11) Номер международной публикации: WO 95/04594<br>(43) Дата международной публикации: 16 февраля 1995 (16.02.95) |
| <p>(21) Номер международной заявки: PCT/RU94/00179</p> <p>(22) Дата международной подачи: 5 августа 1994 (05.08.94)</p> <p>(30) Данные о приоритете:<br/>93040902 11 августа 1993 (11.08.93) RU</p> <p>(71) Заявитель (для всех указанных государств, кроме US): ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ ИМ. В.А.ЭНГЕЛЬГАРДА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК [RU/RU]; 117984 Москва, ул. Вавилова, д. 32 (RU) [INSTITUT MOLEKULARNOI BIOLOGII IM. V.A.ENGELGARDTA ROSSIIJSKOI AKADEMIИ NAUK, Moscow (RU)].</p> <p>(72) Изобретатели; и<br/>(75) Изобретатели / Заявители (только для US):<br/>ЕРШОВ Геннадий Моисеевич [RU/RU]; Москва. К460, д. 1121, кв. 309 (RU) [ERSHOV, Gennady Moiseevich, Moscow (RU)]. КИРИЛЛОВ Евгений Владиславович [RU/RU]; 141700 Долгопрудный, ул. Первомайская, д. 30/3 (RU) [KIRILLOV, Evgeny Vladislavovich, Dolgoprudny (RU)]. МИРЗАБЕКОВ</p>   | <p>Андрей Дарьевич [RU/RU]; 333775 Москва, ул. Профсоюзная, д. 43, корп. 1, кв. 1 (RU) [MIRZABEKOV, Andrei Darievich, Moscow (RU)].</p> <p>(81) Указанные государства: JP, US, европейский патент (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Опубликована<br/>С отчетом о международном поиске.</p> |  |
| <p>(54) Title: METHOD OF DISPENSING MICRO-DOSES OF AQUEOUS SOLUTIONS OF SUBSTANCES ONTO A CARRIER AND A DEVICE FOR CARRYING OUT SAID METHOD</p> <p>(54) Название изобретения: СПОСОБ МИКРОДОЗИРОВАНИЯ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ ВЕЩЕСТВ НА НОСИТЕЛЬ И УСТРОЙСТВО ДЛЯ ЕГО ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The proposed method of dispensing micro-doses of aqueous solutions of substances onto a carrier involves wetting the end face of the rod-shaped transport element with the aqueous solution of the substance in question, formation on the said face of the required dose of the substance, after which it is transferred and brought into contact with the carrier surface. During the process of forming the dose and its transfer, the temperature of the aqueous solution and that of the end face of the transport element are maintained essentially at the dew point of the surrounding air. The claimed device for dispensing micro-doses onto a carrier comprises a base (1) in the form of a plate on one side of which are attached by one end a plurality of rods (2), the faces (3) of the free ends of which are aligned in a single plane. According to the invention, the device is provided with a means for maintaining the temperature of the end faces (3) of the free ends of the rods (2) essentially at the same level as the dew point of the surrounding air. The invention is intended for use primarily in dispensing doses and introducing micro-doses of aqueous solutions containing biological compounds.</p> <div data-bbox="909 1207 1347 1921"> </div> |   |  |

Способ микродозирования водных растворов веществ на носитель заключается в том, что осуществляют смачивание торцевой поверхности транспортирующего элемента стержневидной формы водным раствором вещества, образование на этой поверхности заданной дозы этого вещества, последующее перенесение и соприкосновение ее с поверхностью носителя, при этом температуру водного раствора вещества и температуру торцевой поверхности транспортирующего элемента в процессе образования дозы и ее перемещения поддерживают по существу равной температуре точки росы окружающего воздуха.

Заявляемое устройство микродозирования водных растворов веществ на носитель содержит основание (1) в форме пластины, на одной стороне которой закреплено одними концами множество стержней (2), торцовые поверхности (3) свободных концов которых расположены в одной плоскости. Согласно изобретению, устройство снабжено средством поддержания температуры торцовых поверхностей (3) свободных концов стержней (2) по существу равной точке росы окружающего воздуха.

Изобретение предназначено преимущественно для дозирования и внесения микродоз водных растворов, содержащих биологические компоненты.

#### ИСКЛЮЧИТЕЛЬНО ДЛЯ ЦЕЛЕЙ ИНФОРМАЦИИ

Коды, используемые для обозначения стран-членов РСТ на титульных листах брошюр, в которых публикуются международные заявки в соответствии с РСТ.

|    |                                  |    |  |    |                           |
|----|----------------------------------|----|--|----|---------------------------|
| AT | Австрия                          | FI | Финляндия                                    | MR | Мавритания                |
| AU | Австралия                        | FR | Франция                                      | MW | Малави                    |
| BB | Барбадос                         | GA | Габон  | NE | Нигер                     |
| BE | Бельгия                          | GB | Великобритания                               | NL | Нидерланды                |
| BF | Буркина Фасо                     | GN | Гвинея                                       | NO | Норвегия                  |
| BG | Болгария                         | GR | Греция                                       | NZ | Новая Зеландия            |
| BJ | Бенин                            | HU | Венгрия                                      | PL | Польша                    |
| BR | Бразилия                         | IE | Ирландия                                     | PT | Португалия                |
| CA | Канада                           | IT | Италия                                       | RO | Румыния                   |
| CF | Центральноафриканская Республика | JP | Япония                                       | RU | Российская Федерация      |
| BY | Беларусь                         | KP | Корейская Народно-Демократическая Республика | SD | Судан                     |
| CG | Конго                            | KR | Корейская Республика                         | SE | Швеция                    |
| CH | Швейцария                        | KZ | Казахстан                                    | SI | Словения                  |
| CI | Кот д'Ивуар                      | LI | Лихтенштейн                                  | SK | Словакия                  |
| CM | Камерун                          | LK | Шри-Ланка                                    | SN | Сенегал                   |
| CN | Китай                            | LU | Люксембург                                   | TD | Чад                       |
| CS | Чехословакия                     | LV | Латвия                                       | TG | Того                      |
| CZ | Чешская Республика               | MC | Монако                                       | UA | Украина                   |
| DE | Германия                         | MG | Мадагаскар                                   | US | Соединенные Штаты Америки |
| DK | Дания                            | ML | Мали   | UZ | Узбекистан                |
| ES | Испания                          | MN | Монголия                                     | VN | Вьетнам                   |

## Способ микродозирования водных растворов веществ на носитель и устройство для его осуществления

### Область техники

- 5 Настоящее изобретение относится к области биологии, а точнее к способу микродозирования водных растворов веществ на носитель и устройству для его осуществления.

### Предшествующий уровень техники

- Широко известен способ микродозирования водных растворов веществ на носитель, использующий разрежение среды над поверхностью дозируемого раствора для заполнения замкнутого калиброванного объёма и избыточное давление для его выталкивания из калиброванного объёма в раствор или на поверхность носителя. Устройство для осуществления указанного способа содержит прецизионную пару "цилиндр-поршень", где
- 10 перемещение поршня относительно цилиндра создает разрежение под поршнем и тем самым обеспечивает заполнение подпоршневого пространства микрообъёмом раствора, который при обратном перемещении поршня соответственно выталкивается из заполненного пространства. Увеличение количества одновременно приготавливаемых
- 15 микрообъёмов этим способом достигается путём увеличения числа параллельно работающих каналов. Указанный способ и устройство обеспечивают микродозирование водных растворов веществ в диапазоне от десятков мл. до 1 мкл, с точностью  $0.5\% \div 1\%$  (Cole-Parmer ® micro and macropipettors; L-07839-51 ÷ L-07839-76). Многоканальные устройства
- 20 (Chempette ® multichannel pipettes — L-07915-60) обеспечивают микродозирование соответственно от десятков мл. до 5 мкл, с точностью  $1.5\% \div 2\%$ ; при максимальном числе параллельных каналов 12.

- 2 -

Указанный способ и устройство не пригодны для дозирования объёмов, меньших чем 1 мкл. Кроме того, они характеризуются невысокой производительностью дозирования (максимальное число параллельных каналов 12).

- 5 Известен способ микродозирования водных растворов веществ на носитель используемый в BIOMEK® 1000 Automated Laboratory Workstation производства фирмы BECKMAN для высококачественного переноса клонов, клеточных линий, бактерий, водных растворов ДНК и др. Указанный способ микродозирования включает использование
- 10 транспортирующего элемента стержневидной формы. Способ заключается в смачивании поверхности свободного конца транспортирующего элемента водным раствором вещества, образования на этой поверхности некоторой дозы водного раствора этого вещества с последующим перемещением и соприкосновением дозы с поверхностью носителя. Указанный способ
- 15 основан на использовании сил межмолекулярного взаимодействия на границе раздела фаз жидкость-твёрдое тело.

Известно также устройство для осуществления описанного способа.

- Устройство содержит основание в форме пластины, на одной стороне которой одними концами закреплено 96 иглообразных стержней, торцевые
- 20 поверхности которых расположены в одной плоскости (S91-8545-AP-20; 1991 Beckman Instruments, Inc.; Bulletin No7883).

- Расположение стержней на пластине точно соответствует расположению ячеек, содержащих растворы, на планшете. При этом выпускается два типоразмера стержней, отличающихся диаметром торцевой поверхности
- 25 (0.0015" tip pins — P/N 372172 ; 0.060" tip pins — P/N 372173; S91-8545-AP-20; 1991 Beckman Instruments, Inc.; Bulletin No7883).

Перенос микродоз водных растворов веществ из ячеек планшета на носитель осуществляют следующим образом.

Пластину со стержнями закрепляют в держателе, состыкованном с перемещающейся головкой позиционера. Перемещая головку пластину позиционируют над планшетом так, что над каждой ячейкой оказывается один стержень, затем пластину опускают по координате Z при этом

5 стержни погружаются в ячейки планшета и смачиваются содержащимися в них растворами. После этого пластину поднимают по координате Z, перемещают в пространстве и позиционируют над поверхностью носителя. Затем пластину снова опускают по координате Z до соприкосновения

10 концов стержней с поверхностью носителя, в результате чего микродозы растворов веществ со смоченных концов стержней переносятся на носитель. После этого стержни очищаются, стерилизуются, высушиваются, затем цикл повторяется. Таким образом примерно за 30 минут переносится 1536 образцов на носитель, т.е. известные способ и устройство позволяют

15 повысить производительность дозирования и перенесения водных растворов веществ по сравнению с вышеописанными способом и устройством. Однако, возможности указанного способа ограничены скоростью процесса испарения микродозы жидкости с транспортирующего элемента – стержня.

При уменьшении единичного микрообъёма до десятков и менее

20 нанолитров раствор сильно испаряется, вязкость его увеличивается до такой степени, что становится невозможным перенос дозы раствора на носитель, или даже в процессе переноса микродоза раствора испаряется полностью.

Кроме того, поскольку в известном устройстве торцевая и боковая

25 поверхности стержней имеют одинаковый краевой угол смачивания, на свободных концах стержней микрообъёмы растворов формируются в виде капель захватывая и боковую поверхность, что лимитирует минимальный объём переносимого раствора. По этой же причине ухудшается воспроизводимость микрообъёма капли, так как она зависит от глубины

погружения стержня (при снижении уровня раствора в ячейках планшета изменится глубина погружения).

### Раскрытие изобретения

В основу изобретения положена задача изменить условия проведения  
5 способа микродозирования водных растворов веществ на носитель таким образом, чтобы исключить возможность испарения жидкости со стержневидного транспортирующего элемента и тем самым обеспечить микродозирование минимальных доз водных растворов вещества с повышенной точностью и воспроизводимостью, а также разработать  
10 устройство для его осуществления, которое было бы конструктивно простым, надежным и удобным в эксплуатации.

Задача решена тем, что в заявленном способе микродозирования водных растворов веществ на носитель с использованием транспортирующего элемента стержневидной формы, включающем смачивание торцевой  
15 поверхности транспортирующего элемента водным раствором вещества, образование на этой поверхности заданной дозы этого вещества, последующее перемещение и соприкосновение его с поверхностью носителя, согласно изобретению, температуру водного раствора вещества и температуру поверхности транспортирующего элемента в процессе  
20 образования дозы и ее перемещения поддерживают по существу равной точке росы окружающего воздуха.

Заявляемый способ пригоден для микродозирования любых водных растворов веществ. Предпочтительно используют в качестве водного раствора вещества водный раствор олигонуклеотида. Заявленный способ  
25 позволяет осуществлять микродозирование минимальных (порядка 0.3 нл) объёмов водных растворов веществ. Благодаря подбору указанных условий (поддержание температуры водного раствора вещества и поверхности элемента в процессе перемещения по существу равной точке росы окружающего воздуха) исключается испарение жидкости, что способствует

- 5 -

повышению точности и воспроизводимости процесса микродозирования, упрощается технология, исключается зависимость переносимого микрообъёма от глубины погружения стержней в раствор.

Поставленная задача решается также тем, что, устройство для  
5 микродозирования водных растворов веществ на носитель, содержащее основание в форме пластины, на одной стороне которой закреплено одними концами множество стержней, торцовые поверхности свободных концов которых расположены в одной плоскости, согласно изобретению, снабжено средством поддержания температуры торцовых поверхностей  
10 свободных концов стержней по существу равной точке росы окружающего воздуха.

Предпочтительно в качестве средства поддержания температуры использовать батарею элементов Пельтье, выполненную в форме пластины по размерам основания, контактирующую с основанием со стороны,  
15 противоположной оснащенной стержнями, при этом основание и стержни желательно выполнить из высокотеплопроводного материала. Это позволит легко автоматизировать процесс поддержания заданной температуры с высокой точностью. Кроме того, батарея элементов Пельтье позволяет простым переключением полярности тока питания быстро переводить  
20 стержни из режима охлаждения (поддержание температуры точки росы) в режим нагрева (высушивание стержней после очистки и стерилизации), что сокращает время цикла и тем самым способствует повышению производительности способа, точности и воспроизводимости.

Целесообразно основание и стержни выполнять из металла с большим  
25 коэффициентом теплопроводности, что способствует быстрому выравниванию температуры стержней и в конечном итоге способствует сокращению времени цикла.

Для снижения теплопритока из окружающей среды желательно концы стержней со стороны пластины (не погружаемые в растворы) и поверхности самой пластины снабдить теплоизолирующим покрытием.

5 Целесообразно на торцевые поверхности свободных концов стержней нанести гидрофильное, а на боковые их поверхности — гидрофобное покрытие. Это обеспечивает формирование микрообъемов только на торцевых поверхностях стержней в процессе извлечения из растворов и тем самым повышает точность и воспроизводимость способа.

Предпочтительно площадь торцевой поверхности каждого стержня (для 10 стержней с круглым сечением) выбирать с учетом выполнения соотношения:  $V \approx 1/3 \pi R^3 \cdot 10^{-6}$  (нл), где  $V$  — желаемый объем капли, формирующийся на торцевой поверхности стержня при извлечении из раствора,  $R$  (мкм) — радиус торцевой поверхности стержня.

Для обеспечения точности и воспроизводимости способа целесообразно 15 на торцы стержней нанести покрытие из стекла, а на боковую поверхность — покрытие из фторопласта.

В другом варианте выполнения для обеспечения точности и воспроизводимости способа целесообразно на свободные концы стержней нанести покрытие из стекла при этом боковую поверхность покрытия 20 обработать Repel Silane.

Заявляемое устройство отличается конструктивной простотой, удобно в эксплуатации, не требует для своего изготовления использования дорогостоящих материалов и деталей.

#### Краткое описание чертежей

25 В дальнейшем изобретение поясняется подробным описанием примеров его выполнения со ссылками на прилагаемые чертежи, на которых:

Фиг. 1 изображает устройство для микродозирования водных растворов веществ на носитель, вид сверху;

Фиг. 2 — разрез по II—II на фиг. 1;



- 7 -

Фиг. 3 — участок А на фиг. 2, увеличено;

Фиг. 4 a,b,c,d — фрагмент планшета с раствором и стержень в различных стадиях отбора пробы, продольный разрез;

Фиг. 5 a,b,c,d — фрагмент носителя и стержень в различных стадиях  
5 нанесения пробы, продольный разрез.

#### Лучший вариант осуществления изобретения

Заявленный способ может быть использован для микродозирования водных растворов, содержащих биологические компоненты, фрагменты ДНК, хромосомы, клетки и другие, для микродозирования пигментов, красителей и других. Предпочтительно использовать заявленный способ  
10 для микродозирования водных растворов олигонуклеотидов на носитель. Способ микродозирования водных растворов веществ, согласно изобретению, осуществляют следующим образом. Торцевую поверхность транспортирующего элемента стержневой формы смачивают водным  
15 раствором вещества, находящегося в ячейке планшета. Образующаяся на этой поверхности заданная доза вещества затем перемещается и приводится в соприкосновение с поверхностью носителя (матрица с участками геля), куда она переносится. При этом температуру водного раствора вещества и температуру поверхности транспортирующего элемента в процессе  
20 поддерживают по существу равной точке росы окружающего воздуха, то есть равной температуре, до которой должен охладиться воздух, для того, чтобы содержащийся в нем пар достиг насыщения и начал конденсироваться.

Это позволяет исключить испарение жидкости при образовании на  
25 торцевой поверхности транспортирующего элемента заданной дозы вещества и при ее перемещении, и тем самым повысить точность и воспроизводимость способа микродозирования минимальных объёмов растворов веществ.

- 8 -

Устройство для микродозирования водных растворов веществ, изображенное на фиг. 1, 2, 3, содержит основание 1, имеющее форму прямоугольной пластины, на одной стороне которой закреплено одними концами множество, расположенных параллельно друг другу и на равном расстоянии один от другого стержней 2. При этом торцовые поверхности 3 стержней 2 расположены в одной плоскости, параллельной основанию 1. Со стороны, противоположной оснащенной стержнями 2 к основанию 1 прилегает и находится с ним в тепловом контакте батарея 4 термоэлементов, в данном примере батарея 4 элементов Пельтье, выполненная в форме пластины по размерам основания 1. Посредством проводов 5 батарея 4 подключена к управляемому источнику 6 постоянного тока. Батарея 4 элементов Пельтье является средством поддержания температуры торцовых поверхностей 3 стержней 2 равной по существу температуре точки росы окружающего воздуха. Другой своей стороной батарея 4 элементов Пельтье прилегает к поверхности пластинчатого радиатора 7 и находится с ним в тепловом контакте. Для обеспечения равномерного теплового контакта между поверхностями батареи 4 термоэлементов и основанием 1 с одной стороны и радиатором 7 с другой стороны расположены тонкие (не более 100 мкм) слои 8 теплопроводной пасты, на основе окиси бериллия и полиметилсилоксана.

Основание 1 и стержни 2 выполнены из материала с высоким коэффициентом теплопроводности, предпочтительно, из металла, например, из меди или латуни. В качестве радиатора 7 может быть использована кремниевая пластина.

Стержни 2 со стороны конца, скрепленного с основанием 1, приблизительно на 1/2 их длины снабжены теплоизолирующим покрытием 9, в качестве материала которого может быть использован полиолефин (Heat Shrinkable Pack, RS Components Ltd. Catalogue Nov. 1992 – Feb. 1993, England, p. 51, stock no. 399899). Таким же теплоизолирующим покрытием

9 (пенополиуретан) защищены и контактирующие с окружающим воздухом поверхности основания 1.

Стержни 2 в описываемом примере имеют круглое поперечное сечение (однако, могут иметь поперечное сечение и любой другой формы) и их свободные концы выполнены в форме усеченных конусов, сужающихся к торцам. На торцовые поверхности 3 стержней 2 нанесено гидрофильное покрытие 10, например стекло или золото, на боковые поверхности свободных концов стержней 2 нанесено гидрофобное покрытие 11, например фторопласт, или стекло поверхность которого гидрофобизируется обработкой Repel Silane.

Размер площади торцовой поверхности 3 стержней 2 выбран в соответствии с требуемым объемом  $V$  переносимой дозы из условия выполнения соотношения:  $V \approx 1/3 \pi R^3 \cdot 10^{-6}$  (нл), где  $V$  — желаемый объем капли, формирующийся на торцовой поверхности стержня при извлечении из раствора,  $R$  (мкм) — радиус торцовой поверхности 3

Устройство, в соответствии со способом согласно изобретению, используют следующим образом.

Основание 1 со стержнями 2 позиционируют напротив планшета 12 (фиг. 4а) таким образом, что каждый стержень 2 оказывается напротив соответствующей ячейки 13 планшета 12, заполненной водным раствором 14 вещества, подлежащего переносу, например водным раствором олигонуклеотида. Затем основание 1 перемещают в направлении к планшету 12 до погружения концов стержней 2 (фиг. 4б) в раствор 14. Затем, перемещая основание 1 со стержнями 2 (фиг. 4с) в противоположном направлении извлекают стержни 2 из растворов, при этом на торцовой поверхности каждого стержня 2 формируется микродоза 15 (фиг. 4d) раствора вещества объема  $V$ , который не зависит от глубины погружения стержня 2 в раствор 14 (благодаря гидрофильному и гидрофобному по отношению к переносимому раствору покрытию на

рабочем конце стержня), а определяется по существу лишь радиусом R торцевой поверхности стержня 2. После этого осуществляют перенос основания со стержнями, нагруженными микродозами растворов к носителю, например к микроматрице 16 (фиг. 5а) на стеклянной

5 поверхности которой имеются, расположенные регулярно, соответственно расположению стержней 2, участки 17 геля. Основание позиционируют напротив поверхности матрицы 16 так, что каждый стержень 2 располагается напротив соответствующего участка 17 геля. Затем основание перемещают в направлении к матрице 16 (фиг. 5в) по стрелке В

10 до соприкосновения микродоз 15 с участками 17 геля. В процессе отбора микродоз из ячеек 13 планшета 12 и переноса их до приведения в соприкосновение с поверхностью матрицы 16 температуру растворов 14 в ячейках 13 планшета 12 и температуру торцевых поверхностей 3 стержней 2 поддерживают по существу равной температуре точки росы окружающего

15 воздуха, что позволяет практически исключить испарение раствора при переносе микродозы. Регулирование температуры торцов стержней 2 и поддержание ее на заданном уровне обеспечивают изменением напряжения питания, подводимого к термобатарее 4 (фиг. 2, 3) в зависимости от сигнала датчика температуры (не показан), установленного в тепловом

20 контакте с основанием 1. Гель активно впитывает раствор (фиг. 5с), в результате чего происходит набухание участков 17 (фиг. 5d) геля и переход микродоз 15 (фиг. 5с) в гель. Основание со стержнями 2 отводят от микроматрицы. После промывки и высушивания стержней 2 устройство готово для повторного цикла.

25 Устройство, согласно изобретению, позволяет осуществлять с высокой точностью перенос микродоз водных растворов веществ объемом  $0.3 \div 50$  нл, что позволяет, в свою очередь, упростить процедуру изготовления олигонуклеотидной микроматрицы, сократить расход дорогостоящих материалов, миниатюризировать микроматрицу.

Для лучшего понимания настоящего изобретения приводятся конкретные примеры осуществления изобретения, подтверждающие работоспособность заявляемого способа и устройства, точность и воспроизводимость микродозирования.

#### 5      Пример 1

Осуществляют микродозирование растворов соответствующих концентраций олигонуклеотидов, используемых для иммобилизации олигонуклеотидов на твердом носителе. Приготавливают растворы олигонуклеотидов следующих концентраций: 1,0 нмоль/мкл; 10 пмоль/мкл; 100 пмоль/мкл в 0.001%-ном растворе бромфенолового синего в дистиллированной воде. Растворы загружают в планшет на 1/4÷2/3 глубины ячеек.

В используемом заявляемом устройстве радиус торцевой поверхности стержня составляет  $R=110$  мкм.

15      Стержень погружают в приготовленные растворы, извлекают, при этом на торце стержня формируется объём раствора в виде части полусферы. Из серии 10-ти измерений установлено что капли растворов в виде части полусферы при температуре воздуха равной  $23^{\circ}\text{C}$  и относительной влажности  $70\pm 10\%$  испаряются за 4 сек.

20      Затем температуру приготовленных растворов в планшете устанавливают и поддерживают по существу равной температуре точки росы для окружающих условий на момент проведения измерений. В заявляемом устройстве также устанавливают и поддерживают температуру стержня по существу равную температуре точки росы для условий 25      окружающей среды на время проведения эксперимента.

Цикл измерения заключается в следующем. Стержень погружают в растворы на разную глубину, извлекают, при этом на торце стержня формируется объём раствора в виде части полусферы, и выдерживают в течении 2÷15 минут в таком состоянии. При этом с помощью микроскопа

- марки МБС-10, снабженного окуляром со шкалой (при увеличении 57.5 крат; цена деления шкалы 14 мкм) по высоте части сформированного в виде полусферы объема раствора ведут наблюдение за формированием и изменением микрообъемов растворов на торце стержня. Затем взятую
- 5 пробу переносят на сухой нейлоновый фильтр (Hybond-N+, Amersham International) и измеряют размер полученного пятна. Из проведенных 20-ти измерений установлено, что для проверяемого диапазона концентраций высота формирующихся капель на торце стержня не изменяется в пределах цены деления шкалы прибора (т.е. не зависит от концентрации растворов
- 10 олигонуклеотидов в пределах погрешности измерений), размеры пятен на фильтре одинаковые в пределах цены деления шкалы прибора, что подтверждает точность и воспроизводимость способа. Аналогичные измерения с такими же результатами проводились с использованием в качестве носителя пленки полиакриламидного геля толщиной 5 мкм,
- 15 образованной на поверхности стекла.

### Пример 2

#### Определение точности и воспроизводимости способа

- Воспроизводимость и точность заявляемого способа определяется по разведению дозы раствора красителя, переносимой с помощью
- 20 предлагаемого устройства в известный объем дистиллированной воды и измерением разведения по коэффициенту поглощения света на длине волны, близкой к пику поглощения для данного красителя. При радиусе торцевой поверхности стержня  $R=110$  мкм, расчетный объем капли, сформированной на ней, составляет  $\approx 1.4$  нл. Разведение этой дозы в 500
- 25 мкл объеме дистиллированной воды составит  $5 \times 10^5$  раз.

Приготавливают насыщенный при комнатной температуре раствор красителя Safranin'a MN в дистиллированной воде. Раствор фильтруют на стеклянном фильтре с диаметром пор 100 мкм, разбавляют на 20% и используют как исходный при проведении всех дальнейших измерений.

- 13 -

Для проведения измерений спектров поглощения используют спектрофотометр Shimadzu UV-VIS; Model UV-160 (Shimadzu Corporation).

Приготавливают пробы из указанного исходного раствора красителя  
5 разбавлением его дистиллированной водой в  $10^3$  раза и в  $10^5$  раза. Для  
приготовленных проб измеряют спектр поглощения (в области пика для  
Safranin'a MN). По спектрам измеряют сигналы в пиках и вычисляют их  
отношение. Отношение сигналов для этих двух проб составляет 98, что  
подтверждает возможность использования исходного раствора для  
10 измерения сигналов в пиках спектров поглощения для проб при  
разбавлении исходного раствора до  $10^5$  раза (ожидаемое разбавление  
должно составлять  $5 \times 10^5$  раза). Зависимость измеренного сигнала  $S$  в пике  
поглощения определяется выражением  $S_0 = k' / r$  (1), где  $k'$  – коэффициент  
пропорциональности определяемый из (1) при разведении исходного  
15 раствора  $r = 10^3$  раз,  $r$  – разбавление определяемое из соотношения  
 $r = \frac{V_d + V_k}{V_k}$  (2); где  $V_d$  объём дистиллированной воды,  $V_k$  объём пробы,  
содержащей краситель. Так как  $V_k \ll V_d$ , тогда из (2)  $r \approx \frac{V_d}{V_k}$  (3). После  
подстановки (3) в (1) получим  $S = \frac{k'}{V_d} \cdot V_k$  (4), обозначим  $\frac{V_d}{k'} = k$  (5) и  
подставив в (4) получим выражение  $V_k = S \cdot k$  (6) для пересчета измеренных  
20 сигналов в пиках спектров поглощения для серии измерений, при внесении  
доз исходного раствора со стержня в объём дистиллята воды загруженного  
в измерительную кювету.

$k$  рассчитывается по выражениям (1) и (5) при  $r=10^3$  исходного  
раствора и составляет 349.50 нл.

25 В заявляемом устройстве устанавливают и поддерживают температуру по  
существу равную температуре точки росы для условий окружающей среды

на время проведения эксперимента (температура окружающей среды  $20 \pm 5^\circ\text{C}$  и относительная влажность  $70 \pm 10\%$ ).

- Цикл измерения заключается в следующем. Стержень погружают в исходный раствор, извлекают, при этом на торце стержня формируется объём исходного раствора в виде части полусферы, и выдерживают в течении 2+10 минут в таком состоянии, при этом с помощью микроскопа марки МБС-10, снабженного окуляром со шкалой (при увеличении 57.5 крат; цена деления шкалы 14 мкм) по высоте части полусферы ведут наблюдение за изменением микрообъёма исходного раствора на торце стержня. Чистую кварцевую кювету (промытую дистиллятом) заполняют 700 мкл дистиллированной воды, помещают в спектрофотометр и снимают спектр поглощения (дистиллят — дистиллят), измеряют значение фона  $F$ . Затем в нее погружают стержень устройства, при этом доза исходного раствора со стержня "смывается" в кювету, полученный разбавленный раствор тщательно перемешивают в кювете тонкой стеклянной палочкой. Кювету вновь помещают в спектрофотометр и записывают спектр поглощения разбавленного раствора, а также измеряют величину сигнала  $S$  в пике поглощения. Все результаты измерений получают в виде спектров и записывают средствами спектрофотометра на встроенном принтере.
- Таким образом проводят 10 циклов измерений. Данные измерений представлены в таблице 1.

Оценка действительного значения перенесенного микрообъёма —  $\tilde{V}$  производится по выражению:

$$\tilde{V} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n V_i \quad (7), \quad \text{где } n \text{ — число измерений;}$$

- $V_i$  — значение объёма отдельного измерения из таблицы 1.

Оценка средней квадратической погрешности измерений производится по формуле:



$$\tilde{\sigma} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (V_i - \tilde{V})^2} \quad (8).$$

Так как число измерений ограничено, для определения полуширины доверительного интервала  $\varepsilon_p$  используется закон распределения Стьюдента:

$$5 \quad \varepsilon_p = t_p \frac{\tilde{\sigma}}{\sqrt{n}} \quad (9), \quad \text{где } t_p \text{ — коэффициент распределения}$$

Стьюдента для числа измерений  $n$  с двухсторонней доверительной вероятностью  $p$ , (определяется по таблице 5; "Таблицы по математической статистике", П. Мюллер и др.; издательство "Финансы и статистика", 1982г).

10

Таблица 1

| №  | Фон (F)  | Сигнал,(S) | Объём, нл ( $V=(S-F) \times K$ ) |
|----|----------|------------|----------------------------------|
| 1  | -0.00016 | 0.003889   | 1.414643                         |
| 2  | -0.00048 | 0.005079   | 1.941667                         |
| 3  | 0        | 0.005159   | 1.802976                         |
| 4  | -0.00016 | 0.006508   | 2.33                             |
| 5  | -0.00048 | 0.003968   | 1.553333                         |
| 6  | -0.00032 | 0.004524   | 1.692024                         |
| 7  | 0.000952 | 0.005238   | 1.497857                         |
| 8  | 0.000952 | 0.003889   | 1.02631                          |
| 9  | -0.00063 | 0.00381    | 1.553333                         |
| 10 | 0        | 0.0023571  | 8.238214                         |

Данные измерений приведенные в таблице 1 анализируются, измерение N10 отбрасывается из рассмотрения. Расчет погрешностей проводится по формулам (7), (8) и (9). Для  $n=9$  и  $t_p=2.306$  получено:  $\tilde{V}=1.646$  нл;  $\tilde{\sigma}=0.364$  нл,  $\varepsilon_p=0.29$  нл (при принятой  $p=0.95$ ).

То есть, при доверительной вероятности 0.95, погрешность дозирования составила  $\pm 0.29$  нл или  $\pm 17.6\%$  (допустимая погрешность для дозирования водных растворов олигонуклеотидов на микроматрицу составляет  $\pm 20\%$ ). Теоретически рассчитанное значение переносимого объема ( $V \approx 1.4$  нл. при  $R = 110$  мкм) меньше установленного экспериментально. Это объясняется тем, что концентрация красителя в исходном растворе выбиралась с учетом нижнего предела чувствительности спектрофотометра. Поэтому исходный раствор вынужденно имел вязкость значительно выше теоретически возможной и при извлечении стержня из него покрывал тонкой пленкой часть погружаемой боковой поверхности стержня, чего не происходит в разрешенном диапазоне вязкостей для реальных растворов олигонуклеотидов.

#### Промышленная применимость

Заявляемые способ и устройство находят применение для дозирования и внесения микродоз водных растворов, содержащих биологические компоненты — фрагменты ДНК, хромосомы, клетки и др., как в фундаментальных исследованиях так и в прикладных областях — медицине, сельском хозяйстве. Кроме того, заявляемый способ и устройство могут найти применение и в других областях науки, техники и народного хозяйства, в случаях когда возникает необходимость приготовления большого количества одинаковых микрообъемов водных растворов веществ, перенесения их к объекту и введения их в другие растворы или нанесения на поверхность "твердых" (гели, стекла, пористые) тел.

## Ф рмула изобретения

1. Способ микродозирования водных растворов веществ на носитель с использованием транспортирующего элемента стержневидной формы, включающий смачивание торцевой поверхности транспортирующего элемента водным раствором вещества, образование на этой поверхности заданной дозы этого вещества, последующее перемещение и соприкосновение ее с поверхностью носителя, отличающийся тем, что температуру водного раствора вещества и температуру торцевой поверхности транспортирующего элемента в процессе образования дозы и ее перемещения поддерживают по существу равной температуре точки росы окружающего воздуха.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве водного раствора вещества берут водный раствор олигонуклеотида.

3. Устройство для микродозирования водных растворов веществ, содержащее основание (1) в форме пластины, на одной стороне которой закреплено одними концами множество стержней (2), торцовые поверхности (3) свободных концов которых находятся в одной плоскости, отличающиеся тем, что устройство снабжено средством поддержания температуры торцовых поверхностей (3) свободных концов стержней (2) по существу равной температуре точки росы окружающего воздуха.

4. Устройство по п. 3, отличающееся тем, что в качестве средства поддержания температуры использована батарея (4) элементов Пельтье, выполненная в форме пластины по размерам основания (1), контактирующая с основанием (1) со стороны, противоположной оснащённой стержнями (2), при этом основание (1) и стержни (2) выполнены из теплопроводного материала.

5. Устройство по п.4, отличающееся тем, что пластина и основание (1) выполнены из металла.

6. Устройство по любому из п.п. 3÷5, отличающееся тем, что концы стержней (2) со стороны пластины снабжены теплоизолирующим покрытием (9).

7. Устройство по п. 6, отличающееся тем, что на торцовые поверхности (3) стержней (2) нанесено гидрофильное, а на их боковые поверхности — гидрофобное по отношению к водному раствору покрытие (10, 11 соответственно).

8. Устройство по п. 6, отличающееся тем, что площадь торцевой поверхности (3) каждого стержня (2) выбрана с учётом выполнения соотношения:  $V \approx 1/3\pi R^3 \cdot 10^{-6}$  (нл), где  $V$  — желаемый объём дозы,  $R$  (мкм) — радиус торцевой поверхности (3) стержня (2).

9. Устройство по п. 7, отличающееся тем, что на торцы стержней (2) нанесено покрытие (10) из стекла.

10. Устройство по п. 9, отличающееся тем, что на боковую поверхность стержней (2) нанесено покрытие (11) из фторопласта.

11. Устройство по п. 9, отличающееся тем, что боковая поверхность стержней (2) покрыта стеклом и затем обработана Repel Silane.

1/4

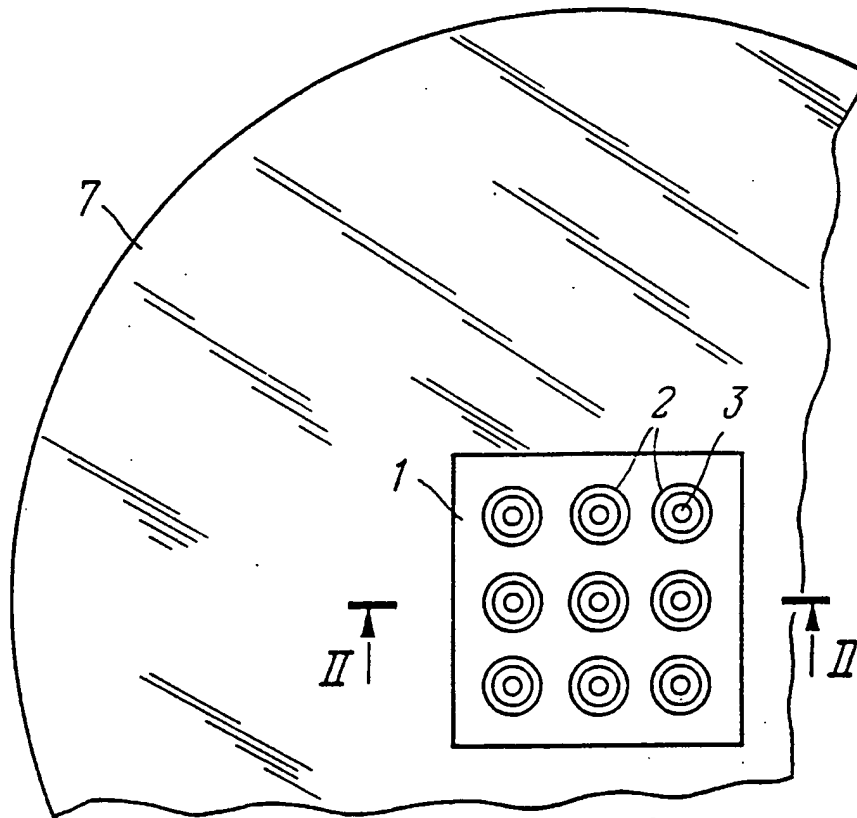


FIG. 1

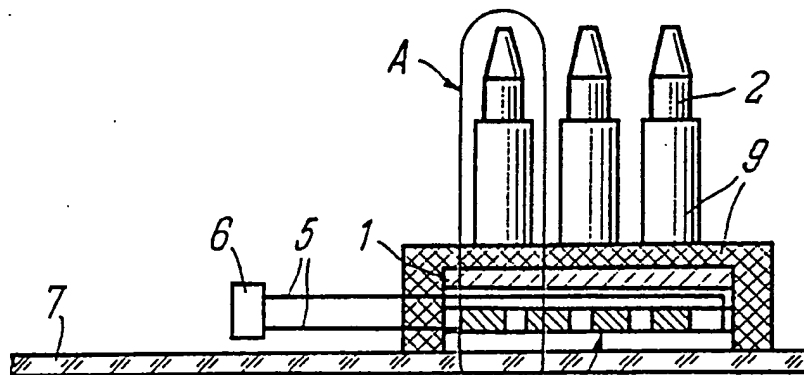


FIG. 2

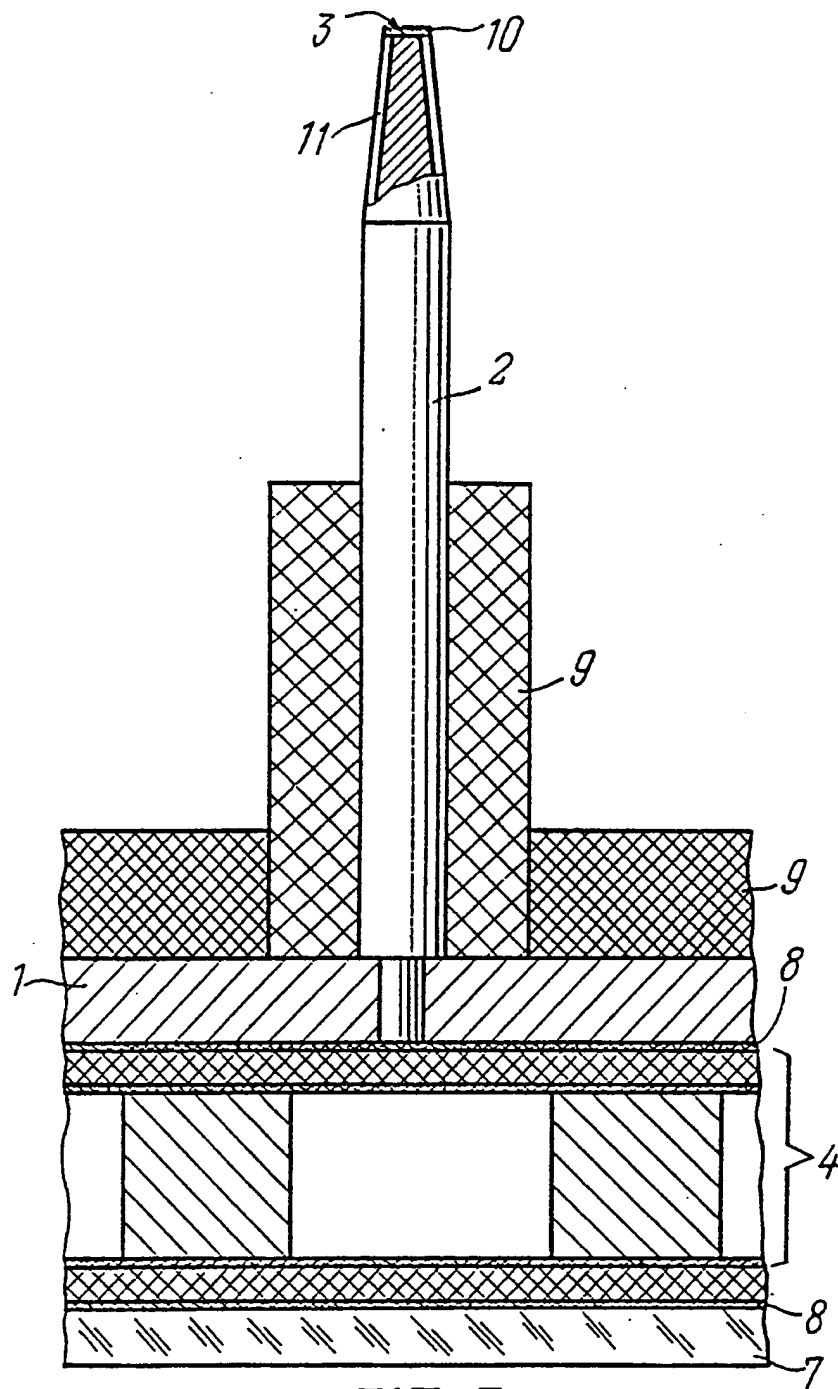
$\frac{2}{4}$ 

FIG. 3

3/4

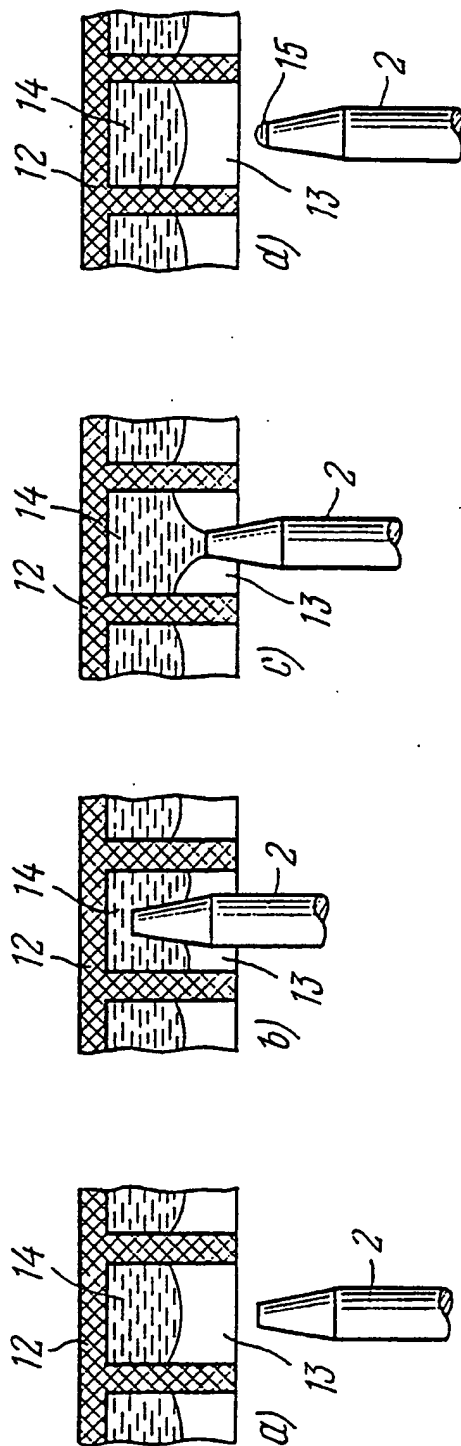
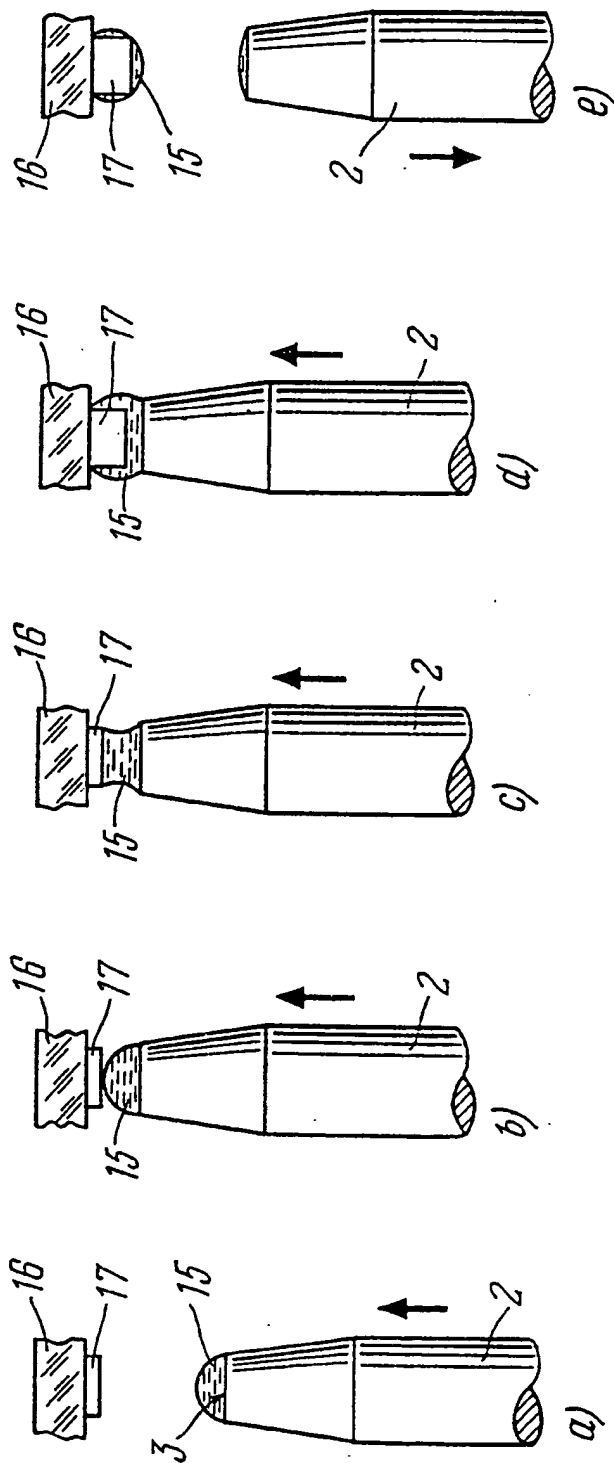


FIG. 4

4 / 4





## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/RU94/00179

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl.<sup>6</sup> B01L 3/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl.<sup>6</sup> B01L 3/00, C12Q 1/00, 4/68, C12M 1/00, 1/34

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| A         | PCT, A1, 93/09872, (SEED CAPITAL INVESTMENTS (SCI) B.V.),<br>27 May 1993 (27.05.93) | 1-11                  |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 September 1994 (23.09.94)

Date of mailing of the international search report

27 October 1994 (27.10.94)

Name and mailing address of the ISA/ RU

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Международная заявка No  
PCT/RU94/00179

|  |  |  |
|--|--|--|
| <p><b>A. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:</b> B01L 3/00<br/>Согласно Международной патентной классификации (МКИ-6)</p>  |  |  |
| <p><b>B. ОБЛАСТИ ПОИСКА:</b></p>   |  |  |
| <p>Проверенный минимум документации (Система классификации и индексы): МКИ-6 B01L 3/00, C12Q 1/00, 1/68, C12M 1/00, 1/34</p>   |  |  |
| <p>Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки:</p>  |  |  |
| <p>Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если возможно, поисковые термины):</p>   |  |  |
| <p><b>C. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ</b></p>   |  |  |
| Категория *)   | Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей            | Относится к пункту No.   |
| A  | PCT, A1, 93/09872, (SEED CAPITAL INVESTMENTS (SCI) B.V.), 27 мая 1993 (27.05.93) | 1-11   |
| <p><input type="checkbox"/> последующие документы указаны в продолжении графы C <input type="checkbox"/> данные о патентах-аналогах указаны в приложении</p>   |  |  |
| <p>* Особые категории ссылочных документов:<br/>         "A" - документ, определяющий общий уровень техники.<br/>         "E" - более ранний документ, но опубликованный на дату международной подачи или после нее.<br/>         "O" - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.<br/>         "P" - документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета.<br/>         "T" - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения.<br/>         "X" - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну и изобретательский уровень.<br/>         "Y" - документ, порочащий изобретательский уровень в сочетании с одним или несколькими документами той же категории.<br/>         "&amp;" - документ, являющийся патентом-аналогом.</p> |  |  |
| <p>Дата действительного завершения международного поиска<br/>23 сентября 1994 (23.09.94)</p>   |  | <p>Дата отправки настоящего отчета о международном поиске<br/>27 октября 1994 (27.10.94)</p> |
| <p>Наименование и адрес Международного поискового органа:<br/>Всероссийский научно-исследовательский институт государственной патентной экспертизы, Россия, 121858, Москва, Бережковская наб. 30-1<br/>факс (095)243-33-37, телетайп 114818 ПОДАЧА</p>   |  | <p>Уполномоченное лицо:<br/>А. Шитов<br/>тел. (095)240-58-88</p>                             |